

# Splanchnic amino acid and ammonia metabolism : studies in the pig

## Citation for published version (APA):

van Berlo, C. L. H. (1988). Splanchnic amino acid and ammonia metabolism : studies in the pig. Maastricht: Rijksuniversiteit Maasticht.

## Document status and date:

Published: 01/01/1988

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## SUMMARY

This thesis contains three major sections. The first section (chapter 1) is a literature review explaining the background of the thesis. In the second section (chapter 2) the animal model, laboratory techniques and measurements used are described. The third section (chapters 3 and 4) contains a description of the actual experiments underlying this thesis.

In an appendix baseline values of amino acid, ammonia, urea, and lactate levels are given.

In chapter 1 a brief review is given of the literature concerning the leading role that ammonia still plays in the postulated pathogenesis of hepatic encephalopathy. Ammonia production and therapies decreasing systemic ammonia levels have always been associated with bacterial mechanisms. Non-bacterial glutamine dependent intestinal ammonia production is reviewed. The gut is viewed as an organ of digestion and absorption, but also as an important regulator in protein metabolism. Interorgan relationships between gut and other tissues (liver, kidney, peripheral muscle) are discussed. The differences in toxicity and ammonia rendering potential of various proteins in liver insufficiency are highlighted. Bacterial and non-bacterial modes of action of neomycin and lactulose in the therapy of hepatic encephalopathy are discussed.

In chapter 2 the use of the pig as an appropriate animal model because of its gastro-intestinal similarity to man is explained. A technique developed in our laboratory to allow unrestrained repeated blood sampling of portal and arterial blood and selectively of small and large bowel veins is described. Electromagnetic flow measurements are used as a means to follow the dynamics of metabolism. For the determination of amino acids we used in addition to a conventional amino acid analyzer (LKB) a fully automated determination of amino acids by a high performance liquid chromatography. The determination of plasma and whole blood ammonia is evaluated in chapter 2.4.

In chapter 3.1. investigations of the role of protein in increasing ammonia liberation are described. In the hierarchy of toxicity of protein during liver insufficiency blood is known to give rise to the highest ammonia levels as compared to isonitrogenous amounts of vegetable, dairy, and meat protein. The importance of this observation resides in the fact that hepatic encephalopathy often occurs after intestinal bleeding. Therefore we studied ammonia, urea, and amino acid levels repeatedly after blood meals in healthy piglets and compared these to normal pigmeals. In a second series of experiments the same procedure was performed after ingestion of an isonitrogenous amount of bovine whole blood, plasma, erythrocytes, and pigfood. Electromagnetic flowmeasurements enabled us to calculate net production or utilization across the bowel. After a blood meal portal ammonia release was increased twofold. Increased glutamine utilization as hypothesized previously could not be detected. Isoleucine levels decreased to 25% of fasting levels. Analysis of blood constituents revealed a

complete lack of isoleucine in the hemoglobin molecule. Net total  $\alpha$ -amino-nitrogen absorption was doubled after a blood meal. These findings lead us to hypothesize that due to complete lack of isoleucine in hemoglobin ingestion of blood into the gut presents the organism with protein of low biological value, leading to decreased protein synthesis and to net protein degradation, which in turn may result in increased ammonia and urea production.

To shed further light on this hypothesis the experiments described in chapter 3.2 were performed. Ingestion of erythrocytes was compared with isonitrogenous amounts of isoleucine enriched erythrocytes. Intestinal but also liver metabolism of amino acids, ammonia, lactate, and urea were calculated. The enrichment of erythrocytes with an excess of isoleucine diminished ammoniagenesis and ureagenesis, but not significantly. Less lactate was metabolized after the isoleucine enriched erythrocyte meal. After enrichment less glutamine was produced in the liver. Less alanine was consumed, indicating that less protein constituents were used in gluconeogenic pathways. These data furnish some support for the hypothesis that the toxicity of blood protein is just the consequence of its biological value. These experiments need to be repeated with smaller amounts of isoleucine because we administered an excess of isoleucine compared to the daily requirements of pigs.

In chapter 4 the hypothesis that lactulose and neomycin might act on glutamine dependent ammonia production is evaluated. Ammonia, amino acids and urea levels were measured in arterial and portal blood of catheterized piglets, pretreated with lactulose or neomycin, before, and after ingestion of normal pigfood and compared with control periods in the same animals. Portal and porta-arterial ammonia differences were significantly decreased after lactulose and neomycin treatment. Alpha-amino-nitrogen absorption decreased in both treatment groups compared to controls, but this decrease did not reach significance. Systemic and portal glutamine levels as well as intestinal glutamine utilization were significantly lower in the treatment groups. Citrulline and glutamate levels and intestinal production decreased after treatment. The decreased systemic and consequently intestinal glutamine utilization may contribute to a reduction of endogenous ammonia formation in the gut wall. An effect of diminished absorption of  $\alpha$ -amino-nitrogen can not be ruled out. These results are in accordance with earlier observations in vivo and in vitro in Wistar rats.

In appendix 1 amino acid, lactate, urea, and ammonia concentrations showed no significant differences during prolonged fasting. Therefore the effects measured in chapters 3 and 4 can be considered to be the result of treatment.

In appendix 2 differences between plasma and whole blood free amino acid levels in the pig model are described and related to differences in the polarity of the amino acids. The preference of plasma amino acid levels in metabolic studies, not dealing with difficult distribution problems, is discussed.

## SAMENVATTING

Dit proefschrift is opgebouwd uit drie delen. Het eerste gedeelte (hoofdstuk 1) geeft een overzicht van de literatuur als achtergrond voor de proeven. In het tweede gedeelte (hoofdstuk 2) worden het proefdiermodel, de laboratorium technieken en meetmethoden beschreven. Het derde deel (hoofdstukken 3 en 4) bevat een beschrijving van de eigenlijke studies die ten grondslag liggen aan dit proefschrift. In twee appendices worden uitgangswaarden van aminozuren, ammoniak, ureum, en lactaat weergegeven.

In hoofdstuk 1 wordt een korte samenvatting gegeven van de literatuur met betrekking tot de nog steeds belangrijke rol die ammoniak wordt toebedeeld in hypothesen die het ontstaan van hepatische encephalopathie trachten te verklaren. Ammoniak produktie is altijd in verband gebracht met bacteriële mechanismen, en therapieën die systemische ammoniakspiegels doen dalen hebben zich bijgevolg steeds geconcentreerd op deze mechanismen. In dit hoofdstuk wordt ook de niet-bacteriële, glutamine afhankelijke, intestinale ammoniak produktie besproken. De darm wordt belicht als een orgaan waar vertering en absorptie plaatsvinden, maar ook als een belangrijke regulator van eiwit metabolisme. Metabole relaties tussen de darm enerzijds, en lever, nier en spierweefsel anderzijds worden verklaard. De tolerantie voor verschillende eiwitten en de mate waarin deze eiwitten bijdragen tot ammoniak vorming worden belicht in relatie tot de ernst van de leverinsufficiëntie. Potentiële bacteriële en niet-bacteriële werkingswijzen van neomycinesulfaat en lactulose, als therapeutica bij hepatische encephalopathie, worden besproken.

In hoofdstuk 2 wordt beschreven dat het jonge varken wordt gekozen als proefdier omdat ruime overeenkomst in morfologie en fysiologie bestaat met de tractus digestivus van de mens. Een in ons laboratorium ontwikkelde techniek voor het stressvrij afnemen van portaal, arterieel, en selectief veneus dun- en dikdarm bloed wordt beschreven. Electromagnetische flowmetingen werden gebruikt om de dynamiek van het metabolisme te volgen. Voor de analyse van aminozuren werd naast de conventionele aminozuuranalysator (LKB) een volledig geautomatiseerde HPLC-techniek, gebaseerd op de ophthaldialdehyde (OPA) derivatiserings reactie gebruikt. De bepaling van plasma en volbloed ammoniak wordt in hoofdstuk 2.4 belicht.

In hoofdstuk 3.1. werd de rol van eiwit in verhoogde ammoniak vorming onderzocht. Het blijkt dat bij leverinsufficiëntie uit bloed meer ammoniak vrijkomt dan uit isonitrogene hoeveelheden plantaardig, zuivel, of dierlijk eiwit. Het belang van deze observatie is gelegen in het feit dat hepatische encephalopathie dikwijls voorafgegaan wordt door maagdarmbloedingen. Daarom werden ammoniak, ureum en aminozuur spiegels gedurende enkele uren na bloedmaaltijden bestudeerd bij jonge, gezonde varkens. Deze waarden werden vergeleken met die verkregen na consumptie van gelijke hoeveelheden stikstof bevattende normale varkensmaaltijden. In een tweede serie experimenten werden dezelfde

bepalingen gedaan na maaltijden bestaande uit isonitrogene hoeveelheden erythrocyten, plasma, volbloed en varkensvoer. Electromagnetische flowmetingen maakten berekening van netto productie of verbruik over de darm mogelijk. Na een bloedmaaltijd steeg de portale ammoniakproductie met een factor twee. Verhoogd glutamineverbruik, zoals eerder gehypothetiseerd, kon niet worden aangetoond. Isoleucine spiegels daalden tot 25% van de waarden na vasten. Analyse van bloedprodukten bracht een geheel ontbreken van isoleucine in het hemoglobine molecuul aan het licht. Netto totaal  $\alpha$ -amino-stikstof absorptie was vertweevoudigd na een bloedmaaltijd. Deze bevindingen leidden tot de hypothese dat tengevolge van compleet afwezig zijn van isoleucine in hemoglobine, opname van bloed in de tractus digestivus het lichaam belast met eiwit van lage biologische waarde. Dit kan leiden tot verminderde eiwitsynthese en tot netto eiwitafbraak, ofwel tot verhoogde ammoniak- c.q. ureumproductie.

Om deze hypothese verder uit te werken werden de experimenten beschreven in hoofdstuk 3.2. uitgevoerd. Het eten van erythrocyten werd vergeleken met evenveel stikstof bevattende hoeveelheden erythrocyten, die verrijkt waren met het ontbrekende isoleucine. Darm en lever metabolisme van aminozuren, ammoniak, lactaat, en ureum werden berekend. De verrijking van erythrocyten met een grote hoeveelheid isoleucine verminderde de ammoniak- en ureumvorming, alhoewel dit effect niet significant was. Er werd minder lactaat gemetaboliseerd na de met isoleucine verrijkte erythrocytenmaaltijd. Na de verrijking werd minder glutamine geproduceerd in de lever. Minder alanine werd verbruikt, hetgeen mogelijk betekent dat minder eiwit werd verbruikt in gluconeogene reacties. Deze data ondersteunen de hypothese dat de toxiciteit van bloedeiwit het gevolg is van de lage biologische waarde ervan. Deze experimenten moeten echter herhaald worden met kleinere hoeveelheden isoleucine, omdat veel meer isoleucine dan de dagelijkse behoefte van een jong varken werd gesuppleerd.

In hoofdstuk vier wordt de hypothese geëvalueerd dat lactulose en neomycinesulfaat hun effect sorteren middels de glutamine afhankelijke ammoniakproductie. Ammoniak, aminozuren en ureumspiegels werden gemeten in arterieel en portaal bloed van gecatheteriseerde jonge varkens, die waren voorbehandeld met lactulose of neomycinesulfaat. De waarden voor, en na opname van standaard varkensvoer werden vergeleken met controle perioden in dezelfde proefdieren. Portale en porta-arteriele ammoniakverschillen waren significant lager na behandeling met lactulose en neomycinesulfaat. Alfa-amino-stikstof absorptie verminderde in beide therapiegroepen vergeleken met controles, maar dit verschil bereikte geen significantie. Systemische en portale glutamine spiegels en intestinale glutamine utilisatie waren significant lager in de behandelde groepen. Systemische citrulline en glutaminezuur spiegels en de intestinale productie ervan verminderden na behandeling. De verlaagde systemische en de dientengevolge verlaagde intestinale glutamine utilisatie kunnen bijdragen tot een vermindering van endogene ammoniak productie in de darmwand. Een effect van verminderde absorptie van  $\alpha$ -amino-stikstof kan niet worden uitgesloten. Deze resultaten zijn in overeenstemming met eerdere observaties in vivo en in vitro in Wistar ratten.

In appendix 1 wordt aangetoond dat aminozuren, lactaat, ureum, en ammoniak concentraties niet significant veranderen gedurende langdurig vasten. Daarom kunnen de effecten gemeten in hoofdstukken 3 en 4 beschouwd worden als het resultaat van behandeling.

In appendix 2 worden verschillen tussen plasma- en volbloed- vrije- aminozuurspiegels in het varkensmodel gerelateerd aan verschillen in polariteit van de aminozuren. De bepaling van plasma aminozuurspiegels in metabole studies wordt vergeleken met de bepaling van volbloed aminozuurspiegels.